

TRANSFORMACIÓN DE LA AFLATOXINA B₁ DE ALIMENTOS, EN EL CANCERÍGENO HUMANO, ADUCTO AFB₁-ADN

Magda Carvajal

Depto. de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: magdac@ib.unam.mx

RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios tóxicos principalmente de los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, son potentes mutágenos y cancerígenos de alimentos y la exposición del hombre a ellas es continuo. Las AF se ligan al ADN, ARN y proteínas formando aductos AFB₁-ADN que se acumulan por años y dañan desde los virus hasta el hombre. Es importante identificar y cuantificar estos aductos como biomarcadores de largo tiempo de riesgo de enfermedad, ya que originan mutaciones y cáncer, y están validados en animales y humanos. Las AF se activan en presencia del citocromo P₄₅₀ como una molécula inestable 8,9 epóxido AFB₁, que se liga al N⁷ de la guanina, y se transforma en los cancerígenos activos o aductos AFB₁-Gua y, finalmente, en los aductos AFB₁-FAPY y son una medida objetiva de la exposición humana a cancerígenos ambientales. Los aductos representan la exposición, absorción, distribución, metabolismo, reparación del ADN y cambio celular. Los temas tratados aquí son la formación de aductos AFB₁-ADN, estudios *in vitro* e *in vivo*, exposición a una dieta con AFB₁, efectos, desarrollo de cáncer y mutaciones en el gen supresor p53, rutas de exposición, vitaminas, tipos de aducto AFB₁-ADN, metodología y su control.

Palabras Clave: Aductos de AFB₁-ADN, biomarcadores, cáncer, control.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are secondary toxic metabolites formed mainly by the molds *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*; they are potent mutagens and carcinogens of foods, and human exposure to them is continuous. AF bind to DNA, RNA and proteins forming AFB₁-DNA adducts that accumulate for years and damage from viruses to humans. To identify and quantify the chemical reactions and molecular biology of these adducts is of primary importance because they are long-term biomarkers validated as a source of mutagenicity and risk of cancer in animals and humans. The cytochrome P₄₅₀ activates AF as an unstable molecule called 8,9 AFB₁ epoxide, that binds mainly to the N⁷ of the guanine nucleotide forming adducts that are the active carcinogens themselves and, as biomarkers, an objective measure of human exposure to environmental carcinogens. Adducts represent an integration of exposure, absorption, distribution, metabolism, DNA repair, and cell turnover. The different issues presented here are the formation of AFB₁-DNA adducts, *in vitro* and *in vivo* studies, dietary AFB₁ exposure, effects, development of human cancer and mutations in the p53 tumor suppressor gene, the effect of diet, routes of exposure, vitamins, kinds of AFB₁-DNA adducts, methodology used for their study and their control.

Key Words: Aflatoxin-DNA adducts, biomarkers, cancer, control.

INTRODUCCIÓN

La palabra "aflatoxina" viene de a = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno. Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios que corresponden químicamente a bis dihidro-furano-cumarinas. Las AF se descubrieron en Gran Bretaña en 1960, después de la muerte de 100,000 pavos alimentados con cacahuete contaminado con el moho *Aspergillus flavus* y AF provenientes de Brasil.

HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS Y CONDICIONES DE PRODUCCIÓN

Los 3 principales hongos o mohos que producen a las AF son *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare y *Aspergillus nomius* Kurtzman con propiedades bien conocidas^[1,2]. Los cereales se invaden con hongos en el campo desde la semilla hasta la post-cosecha, transporte y almacén. Los hongos reducen la viabilidad, cualidades nutricionales y sanitarias de los granos y semillas.

Los mohos aflatoxicógenos^[3] crecen de 8 a 55 °C con temperaturas óptimas de 36 a 38 °C, la producción de AF se inicia de 11 a 14 °C cesando a menos de 10 °C o a más de 45 °C, la producción óptima de AF va de 25 a 35 °C^[4]. La producción de AF se favorece según el sustrato, por factores bioquímicos, biológicos y ambientales a una humedad de 10-20% y a una humedad relativa de 70-90%, equivalente a un contenido de humedad del grano de 16.5 a 18%. Las AF se pueden producir en condiciones de campo o almacén al quinto día y disminuyen al octavo. La presencia de hongos aflatoxicógenos no significa la existencia de AF^[4]. Las especies productoras de AF de *Aspergillus* requieren estar en cultivos puros, pues *A. chevalieri*, *A. candidus* y *A. niger*, compiten e interfieren con ellos, y se han usado como control biológico^[3,4].

OCURRENCIA

Los hongos son capaces de colonizar y producir AF en diferentes medios como son los alimentos para animales y para humanos. Las AF son toxinas de alimentos y la exposición del hombre a ellas es continuo, están en cereales (maíz, arroz, trigo, sorgo, cebada, avena, mijo, centeno y sus productos derivados como tortillas, cereales para el desayuno, harinas, pastas, etc.), en semillas oleaginosas (cacahuete, nueces, avellanas, pistaches, piñones, semillas de girasol, de algodón, ajonjolí y almendras), en especias (chiles, condimentos, paprika, comino, mostaza, etc.)^[4], higos y frutas secas. Las AF son las micotoxinas más tóxicas y dañan a todos los animales (ganado bovino, aviar, equino, porcino, peces, ratas y mascotas como perros y gatos, etc.). Contaminan los productos derivados como huevos, lácteos (leche, yogurt, quesos y crema), también derivados cárnicos como salami, jamón, pechugas de pollo, pathés, embutidos y cervezas, en alimentos balanceados para animales y humanos^[4,5] y sólo hay trazas en vinos. La contaminación por AF en alimentos se produce en almacenes, especialmente si la cosecha está húmeda o en las camas de las aves.

ESTRUCTURA QUÍMICA Y TIPOS DE AF

La estructura básica de las AF^[6] es un anillo dihidrodifurano o tetrahidrodifurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono (Figura 1). Las difuranocumarinas ciclopentanonas de AF de las series B, M, P y Q son las AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁, AFP₁ y AFL.

El segundo subgrupo corresponde a las lactonas difuranocumarinas de la serie G como son AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) y D (AFD), este último derivado del tratamiento de la AFB₁ con amonio. Otro metabolito muy tóxico de la AFB₁ es el aflatoxicol (AFL)^[7]. Sólo las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se sintetizan naturalmente de la AFB₁; las otras AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} y AFL) son hidroxilados productos del metabolismo animal o microbiano. La AFB₁ es la más peligrosa y tóxica de todas^[7].

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS AF

Las AF son cristales sólidos de color que va del blanco al amarillo, sin olor, sin sabor e incoloros, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido), cuando las AF están en cloroformo o benceno son estables por años en refrigeración y oscuridad. Las AF en solución son sensibles a la luz, se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves y se nombran según el color de la fluorescencia que emana con luz UV de onda larga, en color azul B (= blue) con anillo de ciclopentano o verde G (= green) con anillo de lactona, lo que permite detectarlas en trazas de 0.5 ng o menos, en cromatografía de capa fina. Las AFB₂ y AFG₂ tienen difuranos saturados, y AFB_{2a} y AFG_{2a} tienen una unidad difurano hidratada. Los subíndices 1 ó 2 de las AF tipo B, G, M o P indican la movilidad que tienen en la cromatografía de capa fina según su peso molecular, de 298 (AFP₁) a 330 (AFG₂ y AFM₂), que da diferentes coeficientes de retención (RF) que las identifican. Los máximos picos de absorbancia de luz UV son de 265 nm a 362 nm, con una emisión a 425 nm. La Tabla I muestra las propiedades fisicoquímicas de las AF y sus hidroxilados naturales^[4].

Las AF entran al organismo con la comida, a través de la piel o son inhaladas, resisten altas temperaturas de 237 °C (AFG₂) a 320 °C (AFP₁), se descomponen de 237 °C a 306 °C, según el tiempo de calentamiento, la humedad del alimento y el pH. Así, las AF no se rompen con la ultrapasteurización, cocción, freído o hervido, fermentación, ni nixtamalización, pero se pueden destruir si se calientan en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio. Actúan en trazas de millonésimas de gramo (microgramos por kilogramo = µg kg⁻¹) o menos^[4].

Durante la nixtamalización (pH de 8 a 12), el anillo de lactona de la AF se abre y pierde su fluorescencia y se puede pensar que están ausentes, pero en contacto con soluciones ácidas (pH de 1 a 3) del jugo gástrico, y regresando después a un pH neutro, las AF se reactivan y fluorescen otra vez^[8].

PÉRDIDAS ECONÓMICAS POR CONTAMINACIÓN CON AF

El impacto de la contaminación por AF en cultivos se estima en millones de US dólares. La FAO declaró que el 25% de todos los cultivos tienen AF, principalmente cereales, oleaginosas y especias. Una contaminación de 60 a 800 mg kg⁻¹ de AF en

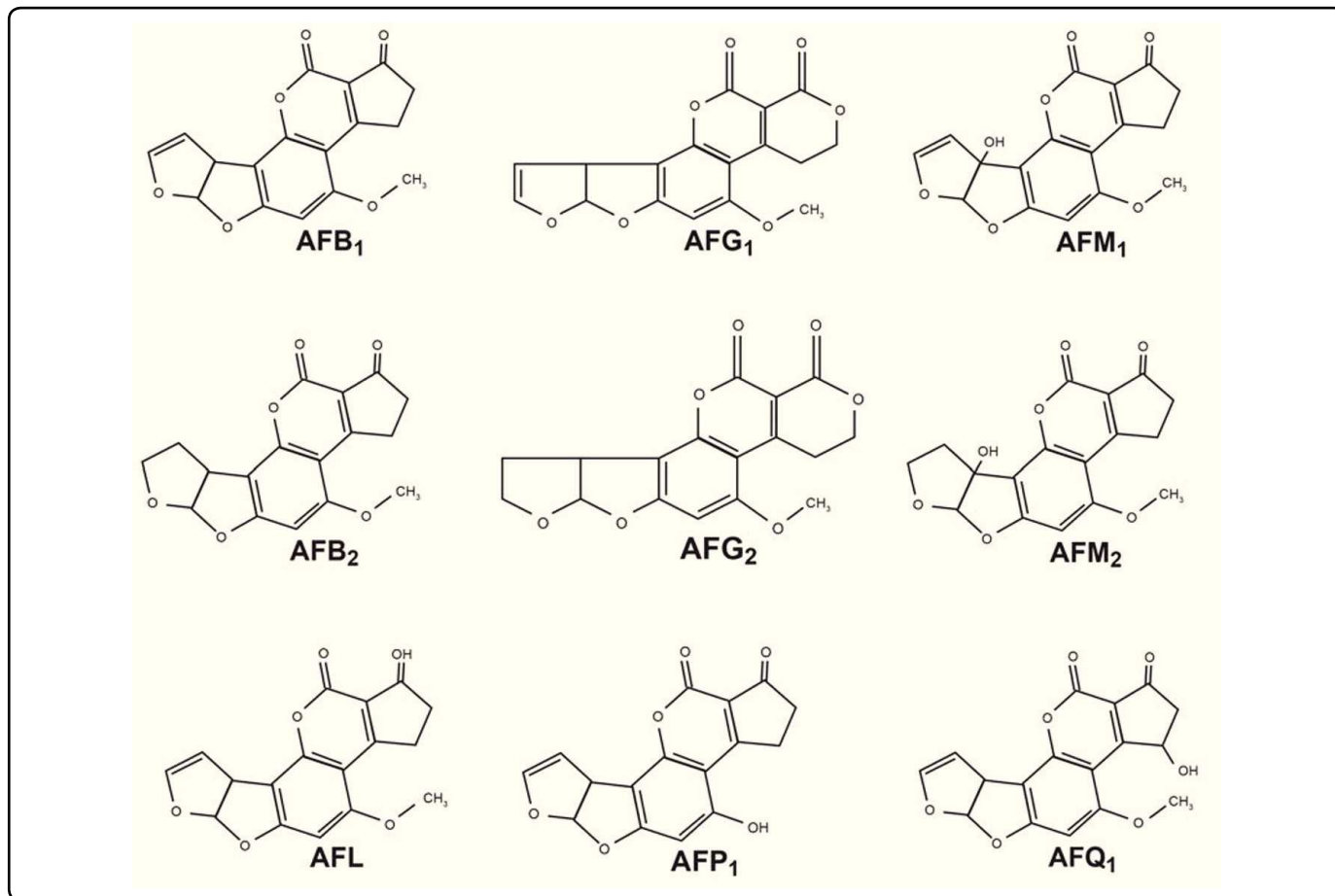


Figura 1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas^[7].

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Absorción ultravioleta (ε)		Emisión de fluorescencia (nm)
				265 nm	360-362 nm	
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12,400	21,800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12,100	24,000	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	9,600	17,700	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	8,200	17,100	450
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O	328	299	14,150	21,250 (357 nm)	425
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12,100 (264 nm)	22,900 (357 nm)	-----
P ₁	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298	>320	11,200 (267 nm)	15,400 (362 nm)	-----
Q ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	-----	11,450 (267 nm)	17,500 (366 nm)	-----
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	10,800 (261 nm)	14,100 (325 nm)	425

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas^[4].

alimentos balanceados para animales bajan su producción, causan diarrea, vómitos, abortos en bovinos y las vacunas no sirven. En los humanos los daños por AF causan gastos por días no laborados, hospitalizaciones, medicinas, abortos, etc.^[7]

BIOSÍNTESIS DE LAS AFLATOXINAS

Los patrones de formación de las AF y de lípidos son similares, vienen de un acetato que es el precursor común. Cuando la glucosa C¹⁴ se incorpora en posición uno en condiciones anaeróbicas, la vía catabólica de la glucosa Emblem Meyerhoff se rompe y favorece la producción de AF. Los precursores metabólicos de la biosíntesis de AFB₁ tienen una estructura básica C₂₀, poli-β-quetido y pertenecen a diferentes grupos como: xantonas (esterigmatocistina, O-metil-esterigmatocistina, aspertoxina), poli-hidroxi-antraquinonas (averufina, O-dimetilnidurufina, ácidos solorínico y norsolorínico, averantina,

1-O-dimetilaverantina, averitrina y acetato versiconal), AF y parasitico^[9].

Las AF se producen por hongos filamentosos cuando la reducción de grupos cetónicos se interrumpe y se favorecen las reacciones de condensación en la ruta metabólica de la producción de ácidos grasos. Este proceso trae la síntesis de compuestos policetónicos (aflatoxinas)^[9]. La ruta bioquímica aceptada para la síntesis de AF comprende alrededor de 23 reacciones enzimáticas, y la mayoría de los genes responsables se han caracterizado y aislado (Figura 2)^[10].

EFFECTOS TÓXICOS DE LAS AFLATOXINAS EN LA SALUD

Las AF se ligan o adhieren a ácidos nucleicos ADN y ARN, y a proteínas, y afectan a todos los seres vivos con ácidos nucleicos, desde virus a vegetales y al hombre^[11]. El ADN

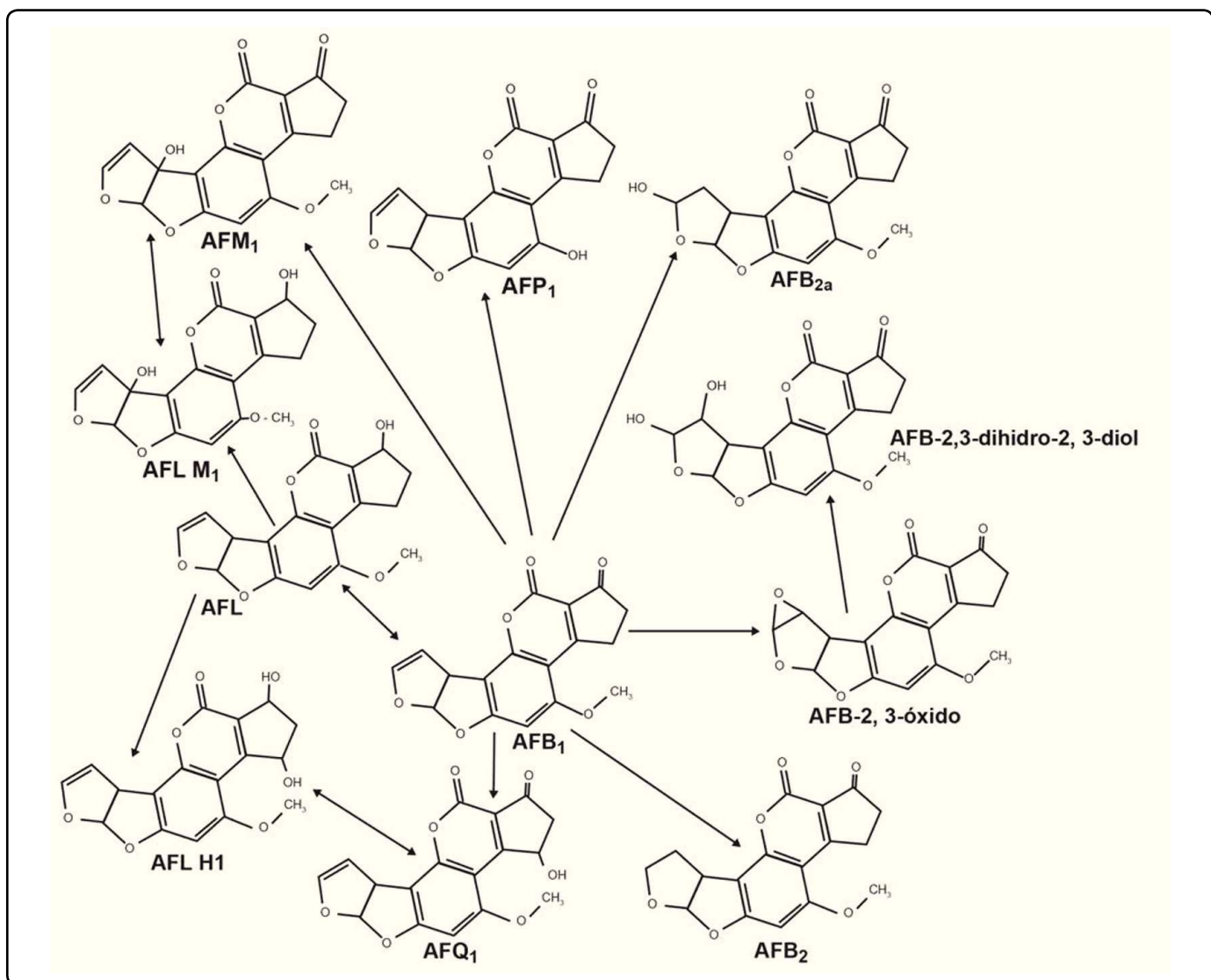


Figura 2. Ruta de biotransformación de AFB₁^[10].

afectado puede almacenar las moléculas de AFB₁ por años, y al tratar de regenerarse corta la porción de nucleótidos donde se pegó la AFB₁ y la elimina por orina, leche o heces fecales. Las AF son compuestos peligrosos y muy tóxicos, son los más potentes cancerígenos biológicos para animales y el hombre^[12], son mutágenos y teratógenos, de acuerdo al siguiente orden: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂. La AFB₁ es la más tóxica con LD₅₀ bajo, junto con la AFM₁ y el aflatoxicol (AFL), y la AFB₂ es 10 veces menos mutágena que la AFB₁^[7]. Cuando se ingieren altas concentraciones de AF en los alimentos, se producen efectos agudos a corto plazo (vómitos, diarreas, hemorragias, necrosis, abortos, defectos en coagulación y muerte), en bajas concentraciones por largo tiempo sus efectos son crónicos (teratogénesis, inmunodepresión, mutagénesis, hepatitis, cirrosis, aplasia del timo y cánceres diversos) y se han asociado con el Síndrome de Reye^[13], con encefalitis y degeneración grasa de las vísceras de los niños, amarillamiento, inmunosupresión, falla renal, neurotóxica o gástrica, kwashiorkor y marasmo^[14]. Las AF afectan la absorción y el metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, y su toxicidad afecta el transporte electrónico de la cadena respiratoria y las membranas celulares y subcelulares. Las AF ingeridas con los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, pasando de la sangre al hígado, riñón, conductos biliares y sistema nervioso. Los cambios citológicos causados por las AF en las células vegetales y animales son similares: nucléolos en forma de anillo con capas diferenciadas, numerosos cuerpos lipídicos, mitocondrias con cisternas alargadas, retículo endoplásmico desgranulado, núcleos alargados e irregulares y cromatina con muchos gránulos^[11]. La AFB₁ actúa como un antimetabolito que se liga al ADN e interfiere con el ARN y la síntesis de proteínas^[4,15].

En China, África y Asia hay evidencias epidemiológicas que relacionan la ingestión de AFB₁ con un aumento de cáncer hepatocelular primario (HCC)^[16]. Los países donde se consumen alimentos enmohecidos tienen mayor incidencia de HCC. En India^[17], tuvieron maíces con 6.25 a 15.6 mg de AF por kg, que causaron daño hepático. En 1974, se presentaron 108 casos de niños que comieron maíz con AF y todos desarrollaron cirrosis hepática. En Tailandia^[18] las AF son endémicas, y se han aislado AFB₁, AFG₁ y AFB₂ de hígado humano y sus metabolitos AFP₁ y AFQ₁ se cuantificaron, y relacionaron con cáncer de colon. Todos los compuestos hidroxilados de AF se han asociado al cáncer humano. En Guangxi, China^[19], hubo HCC por la ingestión diaria de 1 a 2 µg AF/kg de peso corporal. Se correlacionó la susceptibilidad a AF con infecciones de SIDA y con presencia de virus de la hepatitis B (VHB). En 65 mercados de Kenia aparecieron 350 maíces con AF (de 20 a 1000 µg kg⁻¹) que causaron hepatotoxicidad a 317 personas y 125 muertes^[20]. La ingestión diaria en el sureste y noroeste de Estados Unidos es de 0.11 y 0.0002 µg AF por kg diarios^[21].

Han sido reportados diferentes tumores cancerosos por la exposición a AF: HCC, de colon, recto, estómago, glándulas lagrimales, lengua y esófago. Hay una relación directa entre la ingestión de AF y estudios de HCC en Tailandia, Kenia, Mozambique y Suazilandia, más agudos en hombres que en mujeres. La presencia de la infección por VHB es un cofactor importante en la etiología del HCC. El hígado humano parece ser más resistente a desarrollar cáncer por AF que el de rata. La formación reversible del AFL constituye una reserva metabólica de AF relacionada con una alta susceptibilidad al HCC^[16]. Las AF en células embrionarias del pulmón humano inhiben la síntesis de ADN en la mitosis causando vacuolas y células gigantes. Las partículas de polvo y tamo de granos de maíz pueden tener AF y al inhalarlas causar cáncer de pulmón^[22].

Aún se desconocen todas las fuentes de exposición del hombre a las AF y el hígado no es el único órgano blanco, aunque sí el más afectado. La determinación precisa de los daños por AF requiere de la medición de biomarcadores de largo tiempo de consumo, que predigan el estado de salud e inmunología humana^[23]. Muy pocos biomarcadores de largo plazo se han validado en animales experimentales y en el hombre. Las AF son cancerígenos químicos e iniciadores de cáncer y actúan sobre el ADN por un mecanismo genotóxico que requiere una conversión metabólica hacia formas reactivas (electrofilicas) para transformarse en aductos mutágenos, acumularse y producir sus efectos^[24]. El daño al ADN por oxidación o por radiación afecta al metabolismo celular^[25]. El monitoreo de aductos en tejido humano informa sobre la exposición a AF, su relación con el VHB, exposición a una dieta con AFB₁ y al HCC^[26].

La AFB₁ causa aberraciones cromosómicas, ruptura del ADN en células vegetales y animales y mutaciones genómicas en prueba de Ames^[11,27].

La activación metabólica de AFB₁ inicia la formación de aductos que originan al cáncer. La AFB₁ se liga a proteínas como la albúmina, ovalbúmina, ADN y ARN, formando conjugados o aductos que se pueden detectar en sangre, orina y tejidos del organismo que las ingirió^[24]. Los aductos de los tejidos son la medida de la exposición crónica a las AF y reflejan el bombardeo que el ADN sufre en años de exposición. La presencia de un aducto en 1,000,000 de nucleótidos es medida de malignidad en tumores en rata alimentada con AFB₁^[21]. Tan pronto como una persona envejece, su ADN acumula más aductos capaces de producir una mutación o iniciar un cáncer^[28].

ACTIVACIÓN DEL PROTO-ONCOGÉN

Los aductos AFB₁-FAPY se acumulan y con el tiempo, pueden producir mutaciones que inician el proceso canceroso pues son activadores del proto-oncogén H-*ras*^[29]. Los proto-oncogenes celulares de la familia *ras* codifican la proteína p21, que tiene una afinidad por el guanidín-trifosfato (GTP), que es importante en la traducción de proteínas. Estas proteínas p21 se activan

al asociarse a GTP y se inactivan al hidrolizarse en presencia de las enzimas GTPasas (GAP)^[30]. Los proto-genes *ras* sufren mutaciones puntuales y los oncogenes resultantes están activos y producen proteínas que disminuyen la actividad de las enzimas GAP, con menos capacidad para inducir hidrólisis de la GTP en el complejo activo. Es probable que la continua transmisión de las formas mutadas contribuya a la transformación maligna, así como el papel de los genes *ras* en la hepatocarcinogénesis por AFB₁^[28]. El desarrollo de zonas transformadas en el hígado y las células transfectadas originan células tumorales cuando se inyectan en nódulos hepáticos de ratones sin timo. Hay oncogenes en muestras de ADN que vienen de HCC, hay *K-ras* activados en algunos tumores^[31]. Los tumores con *K-ras* activados tienen sustituciones G-C a T-A o G-C a A-T en el codón 12 que coinciden con las producidas cuando la guanina es blanco de AF^[31].

De los más de 100 genes relacionados con el cáncer, la mutación en el gen p53 es la alteración genética más frecuente asociada a neoplasias^[32]. Las funciones de la proteína del gen p53 incluyen: control del ciclo celular, síntesis y reparación del ADN, diferenciación celular, plasticidad genómica y muerte celular programada. Los efectos se asocian con la modulación de la transcripción medida por el gen p53, otros genes supresores y a proto-oncogenes relacionados con el control del crecimiento celular^[32,33]. La alta frecuencia de la mutación específica G a T en el codón 249 del gen p53 en HCC humanos de chinos y africanos, por la ingestión de altas concentraciones de AF, es de gran interés pues otros cánceres humanos tienen mutaciones en el gen p53^[32,33].

La infección crónica por hepatitis B ligada a la proteína, aumenta la mutación del hepatocito por AFB₁ o por su epóxido, quizá por alteración del equilibrio entre la reparación del ADN y

la apoptosis, que son mecanismos de defensa contra el estrés genotóxico^[32,33].

Los cambios en el codón 249 repercuten en la proteína p53, y se induce un crecimiento agresivo en el hepatocito mutante del hígado crónicamente infectado con el VHB, que incrementan las mutaciones en tumores avanzados^[33]. La importancia de las mutaciones en el gen p53 codón 249 por la toxicidad de las AF es controversial^[33], ya que otros cancerígenos diferentes de la AFB₁ produjeron mutaciones en este codón^[32]. Cuando se compararon tumores de pacientes que vivían en áreas con riesgos alto y bajo de daño por AF, la frecuencia de mutaciones en el codón 249 gen p53 no se correlacionaron con la frecuencia de aductos AFB₁-ADN^[32].

TIPOS DE ADUCTOS DE AFB₁-ADN

1. Exo-epóxido-8,9-AFB₁

Las AFB₁ y AFB₂ no son mutagénicas en sí mismas, requieren de bioactivación, para transformarse en exo-epóxido-8,9-AFB₁ o exo-epóxido-8,9-AFB₂^[34]. Estos epóxidos no se han aislado debido a su alta reactividad e inestabilidad para ligarse al ADN y ser cancerígenos^[29]. La AFB₁-2,3-dicloro (AFB₁-Cl₂) se sintetizó como un análogo electrónico del epóxido-8,9-AFB₁^[25]. La toxicidad y potencia cancerígena de las AFB₁ y AFB₂ es por su bioactivación (Figura 3).

2. Aducto AFB₁-Gua

La AFB₁ se activa en el hígado, como epóxido-8,9-AFB₁ que se liga al ADN, ARN o proteínas, primero se liga al N⁷ de la guanina del ADN, sitio de unión y mutación preferente, para formar al aducto 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroxi-AFB₁ abreviado como AFB₁-Gua, que representa al 90% del total de aductos formados en roedores y en el hígado humano^[24,29,35,36], ya sea a partir de la AFB₁ o la AFB₂^[37], con ayuda de la enzima

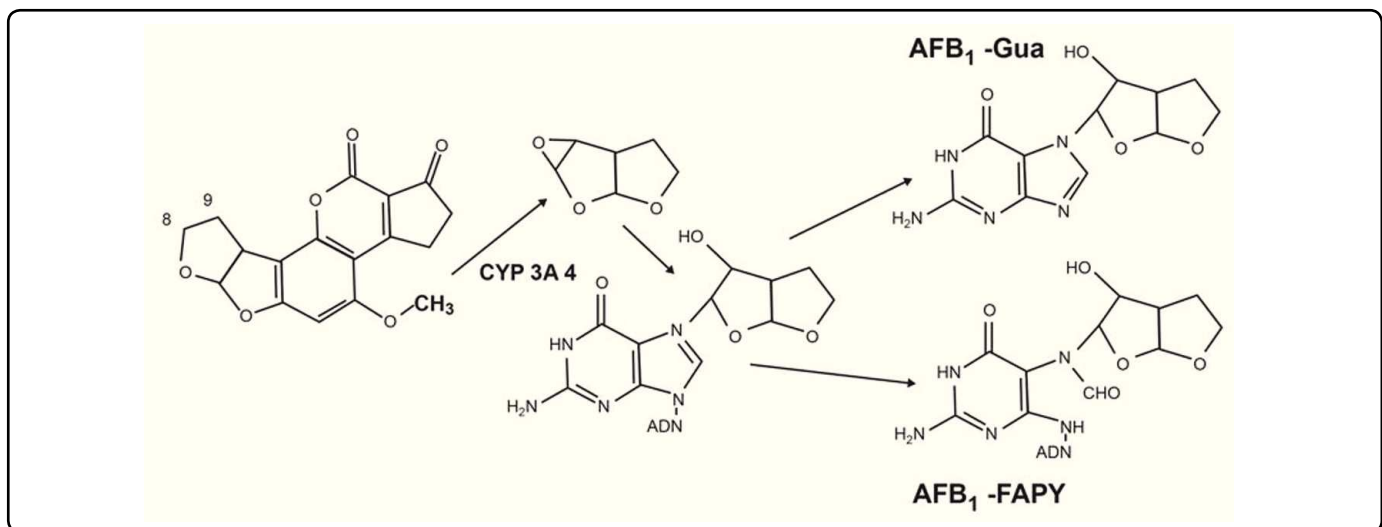


Figura 3. Activación de la AFB₁ para formar el aducto 8,9-AFB₁ epóxido. Estructura parcial de los dos aductos más abundantes^[15].

CYP1A2^[38], eliminado en un 70% por la orina o leche, o puede quedarse en tejidos tumorales, indicando exposición reciente y la medida de reparación del ADN^[24,29], además se comporta como biomarcador de riesgo de enfermedad^[10]. La dosis de AF excretada en orina no es indicativa de la cantidad que se queda adentro, los aductos de orina dan datos complementarios a los aductos de tejidos. La formación del aducto AFB₁-Gua depende de las bases que flanquean la guanina, hay una baja eficacia de la unión cuando la guanina está flanqueada por secuencias ricas en adenina (A)-timina (T), mientras que cuando está flanqueada por otra guanina, la eficacia de la ligadura aumenta^[24,29]. El aducto AFB₁-Gua es un isómero electrofílico muy inestable y puede zafarse del ADN dando un sitio apurínico. No se han detectado aductos estables con la adenina, citosina o timina^[36]. La unión del epóxido-8,9-AFB₁^[39] con ADN es por una intercalación covalente entre la doble cadena de ADN y el AFB₁-exo-8,9-epóxido^[40].

Otros aductos N⁷ menores pueden formarse de la oxidación enzimática de AFP₁, AFM₁ y de otros metabolitos insaturados de AFB₁ en la posición 8,9^[41]. No todas las AFs con doble enlace 8,9 forman aductos directamente. El AFL es un metabolito altamente cancerígeno que actúa como un reservorio que extiende la cancerogenicidad de AFB₁ en algunas especies, especialmente en trucha^[42]. Al menos el 95% del AFL se reconvierte a AFB₁ antes de formar el aducto^[43]. Más del 99% de los aductos de AFL-ADN producidos *in vivo* son idénticos a los producidos por AFB₁^[44].

3. Aducto AFB₁-FAPY

El aducto AFB₁-Gua es muy inestable y puede zafarse del ADN dando un sitio apurínico o bien el anillo imidazol se abre, se hidroliza y forma al aducto ligado a las pirimidinas 8,9 dihidro- 8-(N⁵-formil-2,5,6-triamino-4-oxo-N⁵-pirimidil)-9-hidroxi-laftoxina B₁, abreviado como AFB₁-FAPY, que se acumulan por años y causan mutaciones en el gen p53 y se asocian frecuentemente a neoplasias según los factores hereditarios del organismo^[24,45]. El aducto AFB₁-FAPY se libera del ADN con ácido fórmico^[29]. Después de una exposición aguda o crónica, los aductos AFB₁-FAPY quedan fijados al ADN de los tejidos de especies animales susceptibles y tienen cromatogramas complejos de los aductos^[41,46,47].

La acumulación del aducto AFB₁-FAPY persiste mucho más tiempo en el ADN, y es más importante en los estudios oncológicos aunque es menos frecuente. El mayor nivel de aductos unidos al ADN fue a las 24 h de aplicar 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ a unas ratas. A las 96 h el nivel decreció ligeramente, sin embargo los aductos AFB₁-FAPY ahora representaron el 50% de las AF hidrolizadas^[41,47]. El metabolismo y formación de aductos AF-ADN en trucha arcoiris y en salmón han servido para establecer una dosimetría molecular para comparar diferentes susceptibilidades y predecir tumores de cáncer entre especies^[48].

4. Aductos de AFB₁-proteínas

a. Aductos de hemoglobina

Los aductos de proteína en la sangre se usan para calcular la exposición a cancerígenos electrofílicos. La hemoglobina es abundante y el tiempo de vida de los eritrocitos humanos es de 120 días. Los aductos de hemoglobina son estables y se pueden detectar varias semanas después de la exposición, facilitando un monitoreo retrospectivo. En exposiciones crónicas, los aductos de aminoácidos se acumulan en la hemoglobina y se pueden medir en los eritrocitos^[49,50].

b. Aductos de albúmina

La albúmina es una proteína abundante en la sangre reconocida como medidor de dosis ingerida y que se sintetiza en los hepatocitos, sitio donde muchos cancerígenos se metabolizan a sus formas reactivas, y con una vida de 20 días. La AFB₁ se liga más a la albúmina que a la hemoglobina. La albúmina es un componente del fluido intersticial que rodea a las células y que puede reaccionar con los metabolitos electrofílicos de cualquier tejido. Los aductos formados en el suero de la albúmina tienen una dosimetría similar a la hemoglobina, indican exposición e identifican riesgos. El suero de la albúmina es un medidor más efectivo que la hemoglobina respecto a cancerígenos de alimentos.

Los aductos unidos a la proteína no se reparan y pueden dar lugar a moléculas inestables que pueden desestabilizarla^[51].

c. Aductos de AFB₁-lisina

Los aductos de la AFB₁-albúmina indican la exposición de AF en sangre, donde la AFB₁-lisina es el producto de la digestión de la AFB₁-albúmina usada en estudios animales y humanos. Este aducto muestra la exposición a AF y las relaciones del aducto interno en humanos^[51]. El promedio diario de exposición a las AF, en Gran Bretaña, es de 3 µg de AFB₁ y el promedio interno en ADN de hígado es de 5.9 aductos/10⁷ nucleótidos^[51]. Para facilitar el estudio de aductos de AFB₁-lisina, se desarrollaron anticuerpos monoclonales de ratón que detectarán al conjugado de albúmina de suero bovino de AFB₁-lisina sintética^[52]. El isotipo de uno de estos anticuerpos, IIA4B3, se ha clasificado como inmunoglobulina G₁ (λ, lambda). Las afinidades de IIA4B3 por la AFB₁ y sus aductos asociados y metabolitos son: AFB₁-lisina > AFB₁-FAPY > AFB₁ > AFM₁ > AFQ₁. Un método analítico basado en radioinmunoensayo competitivo con IIA4B3 y [³H]-AFB₁-lisina se validó con un límite de detección de 10 fmol de aducto de AFB₁-lisina^[52]. Se correlacionaron los niveles de aductos de la albúmina de suero con los niveles de aducto de AFB₁-ADN en hígado de diferentes especies de roedores (rata sensible a hámster y ratón resistentes) para ver si puede servir como biomarcador de cualquier especie y conocer las diferentes susceptibilidades a la inducción de tumores por AFB₁ en cualquier especie y en el hombre^[53]. Se puede usar este aducto como biomarcador en estudios de exposición humana a AF y da además el riesgo de alteraciones genéticas consecuentes^[54].

5. Aductos de AFB₁ adenosina y citosina

Se ha reportado menor aducción de AFB₁ a adenina^[55] y citosina^[30] en ADN *in vitro* y falta evidencia de su importancia en la producción de cáncer *in vivo*. Otros biomarcadores son aductos de AFB₁ en ADN de linfocitos y de albúmina de suero.

Los factores relacionados a la formación de aductos AFB₁-ADN son la edad, tabaquismo, alcoholismo, susceptibilidad del órgano para formar aductos (ej. células parenquimales hepáticas, tejido pulmonar, intestino delgado, cultivo traqueal, placenta, radicales intermedios de la bilis, etc.) y modulación de la temperatura del metabolismo hepático de AFB₁. Con respecto a la edad y a la susceptibilidad de diferentes órganos a formar aductos, la glutatión transferasa disminuye cuando hay muchos aductos AFB₁-ADN en el hígado y se correlacionan con el aumento de tumores por AFB₁ en ratones recién nacidos^[15]. La hidrólisis de los aductos AFB₁-ADN es mayor en ratones recién nacidos y contribuye a remover más rápido los aductos. Hay factores endógenos que afectan, como la edad, el hábito de fumar tabaco o tomar alcohol y se asocian a un mayor porcentaje de aductos AFB₁-Gua excretados, indicando más actividad de la AFB₁. No hubo relación entre aductos AFB₁-ADN y el antígeno al VHB, nivel educacional o raza^[14].

Otros factores del huésped pueden modificar los efectos tóxicos de las AF, principalmente hormonas relacionadas con el sexo, la cantidad de alimento ingerido y otras interacciones ambientales. Hay estudios^[56] acerca de la influencia de la grasa de la dieta en la bioactivación hepática de AFB₁ en ratas. Dietas altas en azúcares y bajas en grasa reducen los microsomas y favorecen la epoxidación de AFB₁, más que las dietas altas en grasa. El daño en ADN se relaciona con la aparición de tumores malignos^[57]. El ayuno y la restricción calórica reducen la activación metabólica, y bajan tanto la cantidad de aductos (un 50%) como el riesgo de cáncer^[58-60].

La luz, riboflavina y carotenos afectan la respuesta de la rata a la toxicidad aguda por AF y se desconoce la influencia de las hormonas y de la nutrición en el cáncer inducido por AF. Las ratas tratadas con fenobarbital, y a las que se les extrajo la hipófisis, presentan cambios en el metabolismo de la AFB₁ y muy pocos aductos AFB₁-ADN unidos a las macromoléculas en los hepatocitos.

Enzimas. Las lipoxigenasas y la prostaglandina H sintetasa son enzimas que juegan un papel importante en la bioactivación de la AFB₁ en tejidos hepático y extra-hepático^[61]. **Vitaminas.** Hay una asociación entre la presencia del aducto de orina AFB₁-Gua con los niveles de α -tocoferol (vitamina E), licopeno (pigmento vegetal anti-oxidante rojo), con α y β -caroteno (precursores de la vitamina A) y colesterol en el plasma sanguíneo a diferentes niveles de exposición de AFB₁. No hubo asociación entre la presencia de aductos y los niveles de retinol, testosterona, vitamina E y β -caroteno, los cuales aumentaron la formación de

aductos AFB₁-ADN, y hay una relación entre los micronutrientes del plasma y el riesgo de AFB₁-relacionada con HCC^[62]. Otros datos contrarios reportan que el β -caroteno controló la formación de aductos de AFB₁^[63]. Con respecto a las vitaminas y carotenoides^[64], en la carcinogénesis del hígado por AFB₁, el licopeno y un exceso de vitamina A no tuvieron efecto, pero el β -apo-8'-carotenal, cantaxantina y la astaxantina redujeron el tamaño de focos preneoplásticos^[63].

Rutas de exposición para la formación de aductos en ADN.

La inhalación de AFB₁ es una ruta efectiva de exposición en ratas y hámsters que produce daño genotóxico en el hígado^[65]. La administración intratraqueal de AFB₁ aumentó un poco su presencia en ADN hepático en contraste con la gran fijación observada con animales que recibieron la AFB₁ en forma intraperitoneal. Los pulmones son el segundo órgano en importancia en retener un 66% de [³H] AFB₁ trititada. Los macrófagos alveolares poseen una función oxidativa específica para activar la AFB₁ y formar epóxido^[66]. La mucosa nasal con las enzimas de la familia P₄₅₀ del gen 2A de algunos mamíferos (conejo, rata y humano), los hace susceptibles a la formación del aducto AFB₁-Gua. La formación de aductos de AFB₁-ADN por microsomas nasales decrece con la nicotina^[67].

METODOLOGÍA

Los métodos para estudiar a los aductos de AFB₁-ADN, son un muestreo representativo del lote con muestras bien homogeneizadas. En el caso de alimentos balanceados o granos, una submuestra de 50 g se licúa con solventes orgánicos (metanol, cloroformo o acetónitrilo) para extraer a las AF y se filtra. La concentración y purificación de AF del filtrado diluido en amortiguador de fosfatos (PBS) 1:5 v/v a pH 7.4, se realiza utilizando columnas de inmunofinidad para AF totales previamente activadas con 20 mL de PBS a pH 7.4. La columna debe recibir 1 g de muestra, se eluye con 2 mL de metanol, ACN o cloroformo.

En el caso de aductos de AFB₁-ADN la muestra de tejido, orina, leche o sangre animal o humana se homogeneiza, se purifica el ADN con proteasa y se elimina al ARN con nucleasas, se hidroliza hirviéndolo con HCl hasta depurarlo para romper el ADN y se pasa por una columna de inmunofinidad. Finalmente se aplica el método de ELISA Inhibitorio Indirecto que detecta desde picogramos hasta fentogramos de aducto^[68], o sea una molécula de aducto de AFB₁-ADN en un universo de 10,000,000,000,000,000 (10⁻¹⁵) nucleótidos de ADN.

Los métodos para analizar aductos de AFB₁-ADN son: a) cromatografía de líquidos (HPLC) a alta presión y fase reversa^[29]; b) HPLC con detección de fluorescencia^[69]; c) HPLC con electrospray y espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS)^[70]; d) reacción de polimerasa en cadena (PCR) con radioinmunoensayo competitivo^[51]; e) métodos radioactivos con ADN marcado con C₁₄^[37]; f) espectroscopía de resonancia electro

spin^[71]; g) ELISA con anticuerpos monoclonales^[72]; h) análisis de inmunofluorescencia indirecto^[73]; i) prueba de Ames^[74,75]. Los métodos antes mencionados, junto con la espectrometría UV, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas (MS), fueron consistentes al probar que el fotoaducto AFB₁-N⁷-guanina es el más frecuente y se encuentra en mayor cantidad.

CONTROL

Hay una tasa de reparación natural y remoción de aductos^[76] que reducen la unión a ácidos nucleicos con resistencia a la AFB₁, o bien con preexposición a AFM₁^[77,78]. Los aductos pre-existentes modulan la formación de aductos AFB₁-ADN^[26].

La actividad de las enzimas destoxicantes glutatión transferasa (GTS) se incrementa en animales que ingieren AFB₁ crónicamente en los alimentos, y reduce la unión de la AFB₁ a las macromoléculas^[79-81]. En trucha, la enzima inhibitoria de aductos es la β-naftoflavona (BNF)^[80,81]. La P₄₅₀ 2A5 es un citocromo de ratones que cataliza la oxidación de la AFB₁ al epóxido 8,9 AFB₁^[82], para ello se usan levaduras recombinantes^[83].

La etoquinina (EQ) antioxidante y la reductasa aldehído-AFB₁ (AFB₁-AR), protegen contra la formación de aductos unidos a proteína^[84] e inhiben las lesiones por AFB₁.

Hay compuestos químicos protectores que retrasan o curan el cáncer como los antiestrógenos, antiinflamatorios, antioxidantes y otros agentes de la dieta^[85]. La indometacina^[22], ditioneolona de dieta (DTT)^[86], hidroxitolueno butilado (BHT)^[87], ácido nordihidroguaiarético^[88] y selenio^[89] son potentes protectores contra HCC por AFB₁, que redujeron los aductos AFB₁-N⁷-Gua por inducción de GSH-S-transferasas. La dosis alta de BHT causa efectos patológicos.

Alimentos como las crucíferas contienen ditioneolonas que inhiben al cáncer^[90], las coles de Bruselas disminuyeron un 50-60% la unión AFB₁-ADN del aducto y aumentaron las actividades hepáticas e intestinales de la GST^[91]. El indol-3-carbinol (I3C), de las crucíferas inhibieron *in vivo* la formación de aductos AFB₁-ADN un 68% y combinado con BNF inhibieron 51%^[92]. El brócoli tiene glucorafanina que es un glucosinolato que se hidroliza como sulforafano por la microflora intestinal y es un inductor de enzimas destoxicantes^[93,94]. El oltipraz^[90] es un derivado sintético del brócoli, previamente usado en humanos como medicamento anti-schistosoma, útil para consumidores de comida con AFB₁, en regiones con alta incidencia de cáncer de hígado^[95], es un potente inductor de la GST, enzima destoxicadora de la Fase II que inhibe el cáncer de vejiga, colon, pecho, estómago y piel, pero no ha sido relevante en poblaciones humanas^[96]. La cumarina^[97] protege contra el origen del cáncer hepático por AFB₁ en rata. El ácido elálgico^[75] es un fenol vegetal de varias frutas y nueces que inhibe la mutación por AFB₁, y reduce los aductos AFB₁-ADN y el daño en ADN en tejido

traqueobronquial de rata y humano. El cafestol y el kahweol son diterpenos quimioprotectores y anticancerígenos de granos de café verdes y tostados^[98]. Los monoterpenos redujeron la formación de aductos en ratas expuestas a AFB₁^[99]. El jugo de toronja suprime el daño al ADN por AFB₁^[100]. El β-caroteno no protegió al ADN de las alteraciones producidas por AFB₁ y causaron cambios menores en su metabolismo^[63]. El efecto protector del ácido ascórbico fue ligero en los animales con toxicidad aguda por AFB₁^[101].

Oldenlandia diffusa y *Scutellaria barbata* son plantas usadas en medicina tradicional china para tratar tumores de hígado, pulmón y recto; ellas inhiben la mutagénesis, la fijación al ADN y el metabolismo de AFB₁ bioactivado por Aroclor 1254 en S₉ en rata^[102].

La clorofila es un producto natural útil para reducir los aductos de AF-ADN^[103]. Las bacterias probióticas pueden formar complejos con la AFB₁, bloquear su absorción intestinal y reducir la excreción de AFB₁-Gua asociados con aumento de riesgo de desarrollar HCC^[104].

La información presentada aquí engloba algunos aspectos de los aductos que son interesantes para los científicos y otras especialidades, esperamos haber dado datos de vanguardia acerca de estos importantes biomarcadores.

AGRADECIMIENTOS

A Georgina Ortega Leite y Gerardo Arévalo por su apoyo en la obtención de bibliografía; y a Joel Villavicencio, Jorge López y Alfredo Wong por su apoyo en computación, todos del Instituto de Biología, UNAM.

REFERENCIAS

1. Asao, T. *et al.* Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1706-1707 (1963).
2. Butler, W.H. Aflatoxins in Mycotoxins (ed. Purchase, I.F.H.) 1-28 (Elsevier, Amsterdam, 1974).
3. Diener, U.L. & Davis, N.D. in Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop (eds. Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. & Renfro, B.L.) 298-307 (CYMMYT/UNDP/USDA, El Batán, México, D.F., 1986).
4. OPS-OMS. Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental 11: Micotoxinas (Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica 453, Washington, USA, 1983).
5. Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A. & Rati, E.R. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochem.* **40**, 2859-2864 (2005).
6. Chang, S.B., Abdel-Kader, M.M., Wick, E.L. & Wogan, G.N. Aflatoxin B₂: Chemical identity and biological activity. *Science* **142**, 1191-1192 (1963).
7. Soriano del Castillo, J.M. *et al.* Micotoxinas en alimentos (Ediciones Díaz de Santos, España, 2007). pp: 3-16, 167-170
8. Price, R.L. & Jorgensen, K.V. Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *J. Food Sci.* **50**, 347-349 (1985).

9. Sweeney, M.J. & Dobson, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 149-163 (1999).
10. Eaton, D.I., Ramsdell, H.S., & Neal, G.E. in The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance (ed. Eaton, D.L. & Groopman J.J.) 45-72 (Academic Press, Inc., San Diego, USA, 1994).
11. Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. Mycotoxin Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook 3 (Mercel Dekker, Inc., New York, USA, 1978).
12. Olsen, J.H., Dragsted, I. & Autrup, H. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *Br. J. Cancer* **58**, 236-250 (1988).
13. Reye, R.D.K., Morgan, G. & Baral, J. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: A disease entity in childhood. *Lancet* **2**, 749-752 (1963).
14. Apeagyei, F., Lamplugh, S.M., Hendrickse, R.G., Afframy, K. & Lucas, S. Aflatoxins in the liver of children with kwashiorkor in Ghana. *Trop. Geogr. Med. Home* 9-12 (1982).
15. Jeffrey, A.M. & Williams, G.M. Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**, S628-S635 (2005).
16. Wogan, G.N. Aflatoxins as risk factors for primary hepatocellular carcinoma in humans (Pennington Center Nutrition Series, Louisiana St., USA, 1991).
17. Krishnamachari, K.A., Bhat, R.V., Naragajan, V. & Tilak, T.B. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet* **1**, 1061-1063 (1975).
18. Sornmayura, P. *et al.* Dysplastic nodules and small primary carcinoma of the liver: A study detecting the early morphological changes during hepatocarcinogenesis. *J. Med. Assoc. Thailand* **90**, 352-362 (2007).
19. Groopman, J.D. *et al.* Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi autonomous region, People's Republic of China. *Cancer Res.* **52**, 45-52 (1992).
20. Lewis, L. *et al.* Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health Persp.* **113**, 1763-1767 (2005).
21. Phillips, J.C., Davies, S. & Lake, B.G. Dose-response relationships for hepatic aflatoxin B₁-DNA adduct formation in the rat *in vivo* and *in vitro*: the use of immunoslot blotting for adduct quantitation. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **19**, 157-170 (1999).
22. Donnelly, P.J. *et al.* Biotransformation of aflatoxin B₁ in human lung. *Carcinogenesis* **17**, 2487-2494 (1996).
23. Bronson, R., Birt, D. & Meydani, S.N. Biomarkers as early predictors of long-term health status and human immune function. *Nutr. Rev.* **57**, S7-S12 (1999).
24. Essigmann, J.M., Croy, R.G., Bennett, R.A. & Wogan, G.N. Metabolic activation of aflatoxin B₁: Patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab. Rev.* **13**, 581-602 (1982).
25. Jacobsen, J.S., Refolo, L.M., Conley, M.P., Sambamurti, K. & Humayun, M.Z. DNA replication-blocking properties of adducts formed by aflatoxin B₁-2,3-dichloride and aflatoxin B₁-2,3-oxide. *Mutat Res.* **179**, 89-101 (1987).
26. Ross, M.K., Said, B. & Shank, R.C. DNA-damaging effects of genotoxins in mixture: modulation of covalent binding to DNA. *Toxicol. Sci.* **53**, 224-236 (2000).
27. Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Sciences* **221**, 1256-1264 (1983).
28. Shupe, T. & Sell, S. Low hepatic glutathione S-transferase and increased hepatic DNA adduction contribute to increased tumorigenicity of Aflatoxin B₁ in newborn and partially hepatectomized mice. *Toxicol. Lett.* **148**, 1-9 (2004).
29. Essigmann, J.M. *et al.* Structural Identification of the major DNA adduct formed by Aflatoxin B₁ *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1870-1874 (1977).
30. Yu, F.L., Huang, J.X., Bender, W., Wu, Z. & Chang, J.C.S. Evidence for the covalent binding of aflatoxin B₁-dichloride to cytosine in DNA. *Carcinogenesis* **12**, 997-1002 (1991).
31. Chelcheleh, M. & Allameh, A. *In vivo* biotransformation of AFB₁ and its interaction with cellular macromolecules in neonatal rats. *Mech. Ageing Dev.* **78**, 189-196 (1995).
32. Fujimoto, Y., Hampton, L.L., Luo, L.D., Wirth, P.J. & Thorgeirsson, S.S. Low frequency of p53 gene mutation in tumors induced by AFB₁ in nonhuman primates. *Cancer Res.* **52**, 1044-1046 (1992).
33. Hsieh, D.P.H. & Atkinson, D.N. Recent aflatoxin exposure and mutation at codon 249 of the human p53 gene: lack of association. *Food Addit. Contam.* **12**, 421-424 (1995).
34. Irvin, T.R. & Wogan, G.N. Quantitation of AFB₁ adduction within the ribosomal RNA gene sequences of rat liver DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 664-668 (1984).
35. Lin, J.K., Miller, J.A. & Miller, E.C. 2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of AFB₁-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and in rat liver *in vivo*. *Cancer Res.* **37**, 4430-4438 (1977).
36. Benasutti, M., Ejadi, S., Whitlow, M.D. & Loechler, E.L. Mapping the binding site of Aflatoxin B₁ in DNA: Systematic analysis of the reactivity of Aflatoxin B₁ with guanines in different DNA sequences. *Biochemistry* **27**, 472-481 (1988).
37. Shaulsky, G., Johnson, R.L., Shockcor, J.P., Taylor, L.C.E. & Stark, A.A. Properties of aflatoxin-DNA adducts formed by photoactivation and characterization of the major photoadduct as aflatoxin-N⁷-guanine. *Carcinogenesis* **11**, 519-527 (1990).
38. Troxel, C.M., Buhler, D.R., Hendricks, J.D. & Bailey, G.S. CYP1A induction by β-naphtho flavone, Aroclor 1254 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its influence on AFB₁ metabolism and DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 69-78 (1997).
39. Autrup, H. & Wakhisi, J. in Methods for detecting DNA damaging agents in humans: applications in cancer epidemiology and prevention (eds. Bartsch, H., Hemminki, K. & O'Neill, I.K.) 63-66 (International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications No. 89, Lyon, France, 1988).
40. Gopalakrishnan, S., Harris, T.M. & Stone, M.P. Intercalation of aflatoxin B₁ in two oligodeoxynucleotide adducts: comparative ¹H NMR analysis of d(ATCAFBGAT), d(ATCGAT) and d(ATAFBGCAT)₂. *Biochemistry* **29**, 10438-10448 (1990).
41. Croy, R.G. & Wogan, G.N. Identification of an AFP₁-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 182 (1979).
42. Schoenhard, G.L. *et al.* Aflatoxicol-induced hepatocellular carcinoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the synergistic effects of cyclopropenoid fatty acids. *Cancer Res.* **41**, 1011-1014 (1981).
43. Loveland, P.M. *et al.* AFB₁ and aflatoxicol metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the effects of dietary cyclopropene.

- J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**, 707-718 (1979).
44. Bailey, G.S. *et al.* Quantitative carcinogenesis and dosimetry in rainbow trout for AFB₁ and aflatoxinol, two aflatoxins that form the same DNA adduct. *Mutat. Res.* **313**, 25-38 (1994).
 45. Martin, C.N. & Garner, R.C. Aflatoxin-B oxide generated by chemical or enzymatic oxidation of AFB₁ causes guanine substitution in nucleic acids. *Nature* **267**, 863-865 (1977).
 46. Croy, R.G. & Wogan, G.N. Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B₁. *Cancer Res.* **41**, 197-203 (1981).
 47. Lee, H.S., Sarosi, I. & Vyas, G.N. Aflatoxin B₁ formamido pyrimidine adducts in human hepatocarcinogenesis: a preliminary report. *Gastroenterology* **97**, 1281-1287 (1989).
 48. Dashwood, R.H. *et al.* in Handbook of Applied Mycology. Mycotoxins in Ecological Systems Vol. 5 (eds. Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B. & Arora, D.K.) 183-211 (Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1992).
 49. Osterman-Golkar, S., Ehrenberg, L., Segerbäck, D. & Hallstrom, I. Evaluation of the genetic risks of alkylating agents. *Mutat. Res.* **34**, 1-10 (1976).
 50. Segerbäck, D., Calleman, C.J., Ehrenberg, L., Lofröth, G. & Osterman-Golkar, S. Evaluation of genetic risks of alkylating agents. IV Quantitative determination of alkylating aminoacids in hemoglobin as measure of the dose after treatment of mice with methyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* **49**, 71-82 (1978).
 51. Turner, P.C., Dingley, K.H., Coxhead, J., Russell, S. & Garner, C.R. Detectable levels of serum AFB₁-albumin adducts in the United Kingdom population: implications for AFB₁ exposure in the United Kingdom. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **7**, 441-447 (1998).
 52. Wang, J.S. *et al.* Development of Aflatoxin B₁-lysine adduct monoclonal antibody for human exposure studies. *Applied & Environ. Microbiol.* **67**, 2712-2717 (2001).
 53. Wild, C.P. *et al.* Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative carcinogenesis between animals and humans. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **5**, 179-189 (1996).
 54. Anwar, W.A., Khalil, M.M. & Wild, C.P. Micronuclei, chromosomal aberrations and AF-albumin adducts in experimental animals after exposure to AFB₁. *Mutat. Res.* **322**, 61-67 (1994).
 55. D'Andrea, A.D. & Hasseltine, W.A. Modification of DNA by AFB₁ creates alkali-labile lesions in DNA at positions of guanine and adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4120-4124 (1978).
 56. Hasler, J.A., Dube, N., Nyathi, C.B., Fuhrmann, H. & Sallmann, H.P. The influence of dietary fat on hepatic bioactivation of AFB₁ in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **83**, 279-287 (1994).
 57. Schrage, T.F., Newberne, P.M., Pikul, A.H. & Groopman, J.D. Aflatoxin-DNA adduct formation in chronically dosed rats fed a choline-deficient diet. *Carcinogenesis* **11**, 177-180 (1990).
 58. Chou, M.W. & Chen, W. Food restriction reduces Aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA adduct formation, AFB₁-glutathione conjugation and DNA damage in AFB₁-treated male F344 rats and B6C3F1 mice. *J. Nutr.* **127**, 210-217 (1997).
 59. Chou, M.W., Shaddock, J.G., Kong, J., Hart, R.W. & Casciano, D.A. Effect of dietary restriction on partial hepatectomy-induced liver regeneration of aged F344 rats. *Cancer Lett.* **91**, 191-197 (1995).
 60. Gao, P. & Chou, M.W. Effect of caloric restriction on hepatic nuclear DNA damage in male Fischer 344 rats treated with Aflatoxin B₁. *Toxicol. Lett.* **61**, 233-242 (1992).
 61. Liu, L. & Massey, T.E. Bioactivation of AFB₁ by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P₄₅₀ monooxygenase in guinea-pig tissues. *Carcinogenesis* **13**, 533-539 (1992).
 62. Yu, M.W., Chiang, Y.C., Lien, J.P. & Chen, C.J. Plasma antioxidant vitamins, chronic hepatitis B virus infection and urinary AFB₁-DNA adducts in healthy males. *Carcinogenesis* **18**, 1189-1194 (1997).
 63. Gradelet, S., Le Bon, A.M., Berges, R., Suschetet, M. & Astorg, P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B₁-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of AFB₁ metabolism. *Carcinogenesis* **19**, 403-411 (1998).
 64. Reddy, L., Odhav, B. & Bhoola, K. AFB₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biol. Chem.* **387**, 87-93 (2006).
 65. Zarba, A., Hmielecki, R., Hemenway, D.R., Jakab, G.J. & Groopman, J.D. Aflatoxin B₁-DNA adduct formation in rat liver following exposure by aerosol inhalation. *Carcinogenesis* **13**, 1031-1033 (1992).
 66. Biswas, G. *et al.* Comparative kinetic studies on aflatoxin B₁ binding to pulmonary and hepatic DNA of rat and hamster receiving the carcinogen intratracheally. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **13**, 259-268 (1993).
 67. Putt, D.A., Ding, X., Coon, M.J. & Hollenberg, P.F. Metabolism of aflatoxin B₁ by rabbit and rat nasal mucosa microsomes and purified cytochrome P₄₅₀, including isoforms 2A10 and 2A11. *Carcinogenesis* **16**, 1411-1417 (1995).
 68. Harrison, J.C., Carvajal, M. & Garner, R.C. in Human Carcinogen Exposure. Biomonitoring and Risk Assessment (eds. Garner, R.C., Farmer, P.B., Stell, G.T. & Wright, A.S.) 255-265 (IRL Press, Oxford University Press, 1991).
 69. Sotomayor, R.E. *et al.* Effects of intermittent exposure to AFB₁ on DNA and RNA adduct formation in rat liver: Dose-response and temporal patterns. *Toxicol. Sci.* **73**, 329-338 (2003).
 70. Walton, M. *et al.* Liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of urinary AF biomarkers: characterization and application to dosimetry and chemoprevention in rats. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 919-926 (2001).
 71. Towner, R.A., Qian, S.Y., Kadiiska, M.B. & Mason, R.P. *In vivo* identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1330-1340 (2003).
 72. Hsieh, L.L., Hsu, S.W., Chen, D.S. & Santella, R.M. Immunological detection of AFB₁-DNA adducts formed *in vivo*. *Cancer Res.* **48**, 6328-6331 (1988).
 73. Zhang, Y.J. *et al.* Quantitation of AFB₁-DNA adducts in woodchuck hepatocytes and rat liver tissue by indirect immunofluorescence analysis. *Cancer Res.* **51**, 1720-1725 (1991).
 74. Choi, M.J., Lee, J.W. & Lee, B.M. Comparative assessment of DNA adduct formation, *Salmonella* mutagenicity, and chromosome aberration assays as short-term tests for DNA damage. *J. Toxicol. Environ. Health.* **49**, 271-284 (1996).
 75. Mandal, S. *et al.* Inhibition of aflatoxin B₁ mutagenesis in *Salmonella typhimurium* and DNA damage in cultured rat and human tracheobronchial tissues by ellagic acid. *Carcinogenesis* **8**, 1651-1656 (1987).
 76. Denissenko, M.F., Cahill, J., Koudriakova, T.B., Gerber, N. & Pfeifer, G.P. Quantitation and mapping of AFB₁-induced DNA damage in genomic DNA using AFB₁-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat. Res.* **425**, 205-211 (1999).

77. Louny, D.N. & Hsieh, D.P. Effects of chronic exposure to AFB₁ and AFM₁ on the *in vivo* covalent binding of AFB₁ to hepatic macromolecules. *J. Toxicol. Environ. Health* **13**, 575-587 (1984).
78. Knight, L.P., Primiano, T., Groopman, J.D., Kensler, T.W. & Sutter, T.R. cDNA cloning, expression and activity of a second human AFB₁-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis* **20**, 1215-1223 (1999).
79. Urban, J.D. *et al.* Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 1-13 (2007).
80. Takahashi, N., Harttig, U., Williams, D.E. & Bailey, G.S. The model Ah-receptor agonist β -naphthoflavone inhibits aflatoxin B₁-DNA binding *in vivo* in rainbow trout at dietary levels that do not induce CYP1A enzymes. *Carcinogenesis* **17**, 79-87 (1996).
81. Im, S.H., Bolt, M.W., Stewart, R.K. & Massey, T.E. Modulation of AFB₁ biotransformation by β -naphthoflavone in isolated rabbit lung cells. *Arch. Toxicol.* **71**, 72-79 (1996).
82. Pelkonen, P., Lang, M.A., Negishi, M., Wild, C.P. & Juvonen, R.O. Interaction of AFB₁ with cytochrome P₄₅₀ 2A5 and its mutants: correlation with metabolic activation and toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 85-90 (1997).
83. Pelkonen, P., Lang, M., Wild, C.P., Negishi, M. & Juvonen, R.O. Activation of AFB₁ by mouse CYP2A enzymes and cytotoxicity in recombinant yeast cells. *Eur. J. Pharmacol.* **292**, 67-73 (1994).
84. Hayes, J.D., Judah, D.J. & Neal, G.E. Resistance to AFB₁ is associated with the expression of a novel aldo-keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde-containing metabolite of the toxin. *Cancer Res.* **53**, 3887-3894 (1993).
85. Tamimi, R.M., Lagiou, P., Adami, H.O. & Trichopoulos, D. Prospects for chemoprevention of cancer. *J. Intern. Med.* **251**, 286-300 (2002).
86. Egner, P.A., De Matos, P., Groopman, J.D. & Kensler, T.W. Effect of 1,2-dithiole-3-thione, a monofunctional enzyme inducer, on Aflatoxin-DNA adduct formation in rat liver. *Proc. Annual Meeting of the Am. Assoc. Canc. Res.* **31**, 119 (1990).
87. Allameh, A. Comparison of the effect of low- and high-dose dietary butylated hydroxy toluene on microsome-mediated AFB₁-DNA binding. *Cancer Lett.* **114**, 217-220 (1997).
88. Salocks, C.B., Hsieh, D.P. & Byard, J.L. Effects of butylated hydroxytoluene pretreatment on the metabolism and genotoxicity of AFB₁ in primary cultures of adult rat hepatocytes: selective reduction of nucleic acid binding. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **76**, 498-509 (1984).
89. Shi, C.Y., Chua, S.C., Lee, H.P. & Ong, C.N. Inhibition of AFB₁-DNA binding and adduct formation by selenium in rats. *Cancer Lett.* **29**, 203-208 (1994).
90. Benson, A.B. Oltipraz: a laboratory and clinical review. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **17F**, 278-291 (1993).
91. Salbe, A.D. & Bjeldanes, L.F. Effect of diet and route of administration on the DNA binding of AFB₁ in the rat. *Carcinogenesis* **10**, 629-634 (1989).
92. Stresser, D.M., Williams, D.E., McLellan, L.I., Harris, T.M. & Bailey, G.S. Indole-3-carbinol induces a rat liver glutathione transferase subunit (Yc2) with high activity toward AFB₁ exo-epoxide. Association with reduced levels of hepatic AF-DNA adducts *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* **22**, 392-399 (1994).
93. Kensler, T.W. *et al.* Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of AF-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo Township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 2605-2613 (2005).
94. Kensler, T.W. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ. Health Perspect.* **105 Suppl**, 965-970 (1997).
95. Bolton, M.G. *et al.* Transient intervention with oltipraz protects against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Res.* **53**, 3499-3504 (1993).
96. O'Dwyer, P.J. *et al.* Modulation of gene expression in subjects at risk for colorectal cancer by the chemopreventive dithiolethione Oltipraz. *J. Clin. Investig.* **98**, 1210-1217 (1996).
97. Kelly, V.P. *et al.* Chemoprevention of AFB₁ hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of AFB₁-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H: quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Res.* **60**, 957-969 (2000).
98. Cavin, C., Holzhauser, D., Constable, A., Huggett, A.C. & Schilter, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against AFB₁-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis* **19**, 1369-1375 (1998).
99. Elegbede, J.A. & Gould, M.N. Monoterpenes reduced adducts formation in rats exposed to AFB₁. *African J. Biotech. Acad. J.* **1**, 46-49 (2002).
100. Miyata, M., Takano, H., Guo, L.Q., Nagata, K. & Yamazoe, Y. Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against AFB₁-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis* **25**, 203-209 (2004).
101. Netke, S.P., Roomi, M.W., Tsao, C. & Niedzwiecki, A. Ascorbic acid protects guinea pigs from acute aflatoxin toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 429-435 (1997).
102. Wong, B.Y., Lau, B.H., Yamasaki, T. & Teel, R.W. Inhibition of dexamethasone-induced cytochrome P₄₅₀-mediated mutagenicity and metabolism of AFB₁ by Chinese medicinal herbs. *Eur. J. Cancer Prev.* **2**, 351-356 (1993).
103. Egner, P.A. *et al.* Chlorophyllin intervention reduces AF-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14601-14606 (2001).
104. El-Nezami, H.S. *et al.* Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am. J. Clin. Nutr., Amer. Soc. Clin. Nut.* **83**, 1199-1203 (2006).